

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 341–349

Verbesserte Trihydroxyindolmethode zur Bestimmung der Harnkatecholamine

Von U. Werner

Abteilung für Nieren- und Hochdruckkranke der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Essen

(Eingegangen am 22. November 1974/11. März 1975)

Herrn Prof. Dr. O. H. Arnold zum 65. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Zur Katecholaminabtrennung im Harn wurden kommerzielle Ionenaustauschchromatographiesäulen verwandt. Die Katecholaminbestimmung erfolgte fluorimetrisch mit einer neuen Trihydroxyindolmethode. Durch kombinierte Anwendung von Borsäure, Kupferionen, Mercaptoäthanol und finaler Ansäuerung konnte die Fluoreszenzausbeute im Vergleich zu anderen Trihydroxyindolmethoden für Adrenalin und Noradrenalin gesteigert werden. Die Fluorophore sind sehr stabil: Der Fluoreszenzverlust von Adrenolutin betrug während 180 Minuten 22%, bei Noradrenolutin war kein Verlust nachweisbar. Zur Differenzierung der Amine wird Adrenalin bei pH 2,85 und Noradrenalin bei pH 7 oxidiert. Die Kriterien für eine Analysenmethode werden in bezug auf Empfindlichkeit, Richtigkeit, Präzision und Spezifität erfüllt.

Als Normwerte wurden an einem Kollektiv von 17 gesunden Probanden für Adrenalin ($\bar{x} \pm s$) $44,8 \pm 16,9$ nmol/24 h ($8,2 \pm 3,1$ µg/24 h) und für Noradrenalin ($\bar{x} \pm s$) $224,0 \pm 68,0$ nmol/24 h ($37,9 \pm 11,5$ µg/24 h) gefunden.

Die gleichzeitige Verabfolgung von α -Methyldopa (2 g/d) bei 13 Patienten mit primärer Hypertonie störte die fluorimetrische Bestimmung der Katecholamine nicht.

An improved trihydroxyindole method for the determination of urinary catecholamines

Summary: Commercially available columns for ion exchange chromatography were used for the separation of catecholamines in urine. The estimation of catecholamines was performed fluorimetrically by a new trihydroxyindole method. The fluorescence of adrenaline and noradrenaline was enhanced, in comparison with other methods, by the combined application of boric acid, copper-ions, mercaptoethanol and final reacidification.

The fluorophores are stable: The loss of fluorescence of adrenolutin amounted to 22% during 180 minutes, and there was no loss of noradrenolutin. For the differentiation of amines, adrenaline was oxidized at pH 2.85 and noradrenaline at pH 7. Precision, accuracy, sensitivity and specificity fulfilled the criteria of analysis.

The normal values, determined in a collective of 17 healthy persons, were adrenaline ($\bar{x} \pm s$) 44.8 ± 16.9 nmol/24 h and noradrenaline ($\bar{x} \pm s$) 224.0 ± 68.0 nmol/24 h. The simultaneous application of α -methyldopa (2 g/day) in 13 patients with primary hypertension did not disturb the fluorimetric estimation of catecholamines.

Einführung

Über die fluorimetrische Bestimmung von Noradrenalin und Adrenalin mit der Trihydroxyindolmethode sind zahlreiche Modifikationen publiziert worden (Übersicht bei Udenfriend(1)). Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Adrenalin bzw. Noradrenalin zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom oxidiert werden und diese in stark alkalischem Milieu in die entsprechenden Fluorophore Adrenolutin und Noradrenolutin übergeführt werden.

Diese Lutine sind im alkalischen Milieu nicht stabil.

Um einen Zerfall innerhalb von Minuten (2, 3) zu verhindern, werden Reduktionsmittel zugefügt. Als gutes Reduktionsmittel hat sich Ascorbinsäure bewährt.

Ascorbinsäure hat jedoch den Nachteil, selbst in fluoreszierende Produkte zu zerfallen. Daher wurden verschiedene Stoffe zum Schutz der Ascorbinsäure beigefügt, z. B. Äthylendiamin (4) oder β -Thiopropionsäure (5).

Häggendal (6) ersetzte die Ascorbinsäure durch 2,3-Dimercaptopropanol (BAL) und erhielt eine hohe stabile Fluoreszenz bei niedrigen Leerwerten. Weil-Malherbe & Bigelow (7) benutzten Dimercaptoäthanol und konnten durch Ansäuern auf pH 5 eine weitere Steigerung der Stabilität und Empfindlichkeit erreichen. Dabei ist für die Adrenalinbestimmung der Zusatz von Kupferionen erforderlich, die beim Ansäuern ein Präzipitat bilden, das abzentrifugiert werden muß (7, 8).

Nachstehend wird eine Modifikation der Trihydroxy-indolmethode beschrieben, die mit dem Ziel entwickelt wurde, einerseits praktikabel und zeitsparend zu sein, andererseits eine hohe spezifische Fluoreszenzausbeute zu gewährleisten.

Material und Methoden

Untersuchungsgut

Die 24 Stunden-Sammelurine von 17 normotonen Kontrollpersonen, 13 Hypertonikern, die 9,5 mmol (2 g) α -Methyldopa täglich per os erhielten und einem Patienten mit einem Phäochromocytom wurden untersucht.

Reagenzien

1. Borsäure, 0,67 mol/l (Merck Art. 165)
2. Natriumhydroxid, 0,2 mol/l (Merck Art. 6498)
3. EDTA 26,86 mmol/l (10 g/l) (Merck Art. 8418)
4. Ameisensäure, 2,0 mol/l (Merck Art. 264)
5. Kaliumhexacyanoferrat[III] 7,59 mmol/l (2,5 g/l) (Merck Art. 4973)
6. Kupferacetat, 1 mmol/l (Merck Art. 2711)
7. Reduktionsreagenz:
 - a) Mercaptoäthanol, 0,709 mol/l (50 ml/l) (Serva Art. 28625)
 - b) Natriumsulfit, 1,587 mol/l (200 g/l) (Merck Art. 6657)
 - c) Natriumhydroxid, 10 mol/l (Merck Art. 6498)
 Gleiche Volumina von a, b und c wurden gemischt. Das Reduktionsreagenz ist im geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.
8. Essigsäure, 10 mol/l (Merck Art. 90063)
9. Boratpuffer, 0,67 mol/l, pH 2–10
Borsäure (Reagenz Nr. 1) wurde mit Ameisensäure bzw. Natriumhydroxidlösung elektrometrisch auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.
10. Adrenalin und Noradrenalin-Stammlösung:
54,6 μ mol (10 mg) Adrenalin bzw. 59,1 μ mol (10 mg) Noradrenalin wurden in 1 ml Salzsäure, 1 mol/l, gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und kühl aufbewahrt. Arbeitsstandard: Stammlösung 1: 100 verdünnen, täglich frisch ansetzen, im Eisbad halten.

Feinsubstanzen

Noradrenalin	(Hoechst) ¹⁾
Adrenalin	(Hoechst) ¹⁾
Normetanephrin-HCl	(Hoechst) ¹⁾
Metanephrin-HCl	(Hoechst) ¹⁾
3,4 Dihydroxynorephedrin-HCl	(Calbiochem 3063)
3,4 Dihydroxyphenylglycol	(Calbiochem 308144)
3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylamin-hydrochlorid	(Calbiochem 45426)
α -Methyl-3,4-dihydroxy-phenylalanin	(Hoechst) ¹⁾
3,4-Dihydroxyphenylalanin	(Merck 4196)
Serotonin-Hydrogenmaleinat	(Fluka 85040)
Tyramin-HCl	(Merck 8373)
L-Histidin-HCl	(Serva 24830)
D, L-Tyrosin	(Serva 37520)
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	(Fluka 37860)
3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylenglycol-Piperazinsalz	(Calbiochem 454205)
Histaminumdihydrochlorid	(Merck 4370)
Vanillinsäure	(Roth 4884)
Vanillinmandelsäure	(Calbiochem 4542)
Homovanillinsäure	(Calbiochem 38588)
D, L-Octopamin-HCl	(Calbiochem 49444)
D, L-3,4-Dihydroxymandelsäure	(Calbiochem 3062)
Dopamin-hydrochlorid	(Fluka 56610)

Geräte und Ausrüstung

Kationenaustauschharz-Chromatographiesäulen (0,7 x 5,0 cm) der Firma Bio-Rad Laboratories, München; Amberlite CG 50,

(H⁺), 200–400 mesh der Firma Serva, Heidelberg; Polystyrolröhrchen (16/100, glasklar) der Firma Greiner, Nürtingen; Eppendorf-Pipetten der Firma Eppendorf.

Die fluorimetrische Bestimmung erfolgte mit einem SPF Aminco Bowman Fluorometer mit einem „Condensing mirror system“ (American Instrument Company, Silver Springs, Md., USA). Schlitzweite 2 mm. Xenon Lampe: Osram XBO 150 W/1. Rechteckquarküvetten 1 x 1 x 4,5 cm. Die Empfindlichkeit wurde täglich justiert mit einer Chininsulfatlösung (1 mg/l in 0,1 mol/l Schwefelsäure) bei einer Wellenlänge von 345/450 nm (Anregung/Emission) und einer Standardbestimmung von 59 pmol Noradrenalin nach der Methode von Häggendal (6).

Arbeitsvorschrift

Säulenchromatographie

Der 24-Stunden-Urin wird in einem Gefäß mit 15 ml konzentrierter Salzsäure gesammelt. Etwa 30 ml Urin werden scharf abzentrifugiert und 5 ml davon für die Katecholaminbestimmung entnommen. Der Rest wird für Doppelbestimmungen und für die Bestimmung der Metabolite kühl aufbewahrt.

Ausführung

Der Urin (5 ml) wird mit Natronlauge (0,2 mol/l) auf pH 6,5 eingestellt und mit EDTA (14 ml, 26,86 mmol/l) versetzt. Der so vorbereitete Harn wird über die Säule gegeben. Die Säule wird mit deionisiertem Wasser (3 x 7,5 ml) nachgespült. Die Katecholamine werden mit Borsäure (10 ml, 0,67 mol/l) eluiert.

Die fluorimetrische Bestimmung wird am gleichen Tag vorgenommen.

Bestimmung und Berechnung

Die Reihenfolge für die Präparation der Probe ist zu ersehen aus Tabelle 1. Für die Berechnung der Katecholamine und ihrer Differenzierung in Adrenalin und Noradrenalin gibt es mehrere Möglichkeiten, von denen hier zwei ausführlicher dargestellt werden.

1. Eine exakte Berechnung ist möglich, wenn die Methoden von Crout (9) oder Weil-Malherbe & Bigelow (7) auf die veränderten Volumina entsprechend angewandt werden (Tab. 1). Sie setzt voraus, daß bei pH 2,85 nur Adrenalin oxidiert wird. Sollte mehr als 5% der Gesamtfluoreszenz auf Noradrenalin zurückgehen, ist eine der optischen Differenzierungsmethoden anzuwenden (7, 16).
2. Eine vereinfachte Form der Berechnung ist möglich, wenn Eichgeraden für Adrenalin und Noradrenalin erstellt werden. Es wurden zu je 5 ml Poolurin 0; 2,73; 8,19 nmol Adrenalin sowie 0; 2,95; 8,87 nmol Noradrenalin zugegeben. Von den erhaltenen Fluoreszenzeinheiten werden die Fluoreszenzeinheiten der O-Werte subtrahiert und die Differenz auf Millimeterpapier aufgetragen. Voraussetzung für ein solches Vorgehen ist die tägliche Eichung des Fluorometers.

Adrenalin (nmol/l): Anhand der Nettofluoreszenzwerte ($S_3 - FB_3$) der Harnprobe kann die Adrenalinkonzentration des Harns direkt von der Eichgeraden abgelesen werden.

Noradrenalin (nmol/l): Das Vorgehen bei Noradrenalin ist ähnlich wie bei Adrenalin. Das gefundene Adrenalin wird mit dem Faktor

$$\frac{A_7 (390/470)}{A_3 (415/490)}$$

multipliziert, das Produkt von der Gesamtfluoreszenz der bei pH 7 oxidierten Probe subtrahiert. Der Faktor liegt bei 0,7.

Ergebnisse

Linearität

Wenn Adrenalin bei pH 2,85 und Noradrenalin bei pH 7 oxidiert wurden, konnte ein Linearitätsbereich der Fluoreszenzintensität in einer Konzentration von 1 nmol bis 1 pmol pro Probe nachgewiesen werden.

¹⁾ Wir danken Frau Dr. Busch, Arzneimittelkontor der Firma Hoechst, Köln, für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Tab. 1. Probenansatz

	S ₃	FB ₃	SA ₃	SN ₃	S ₇	FB ₇	SA ₇	SN ₇
Boratpuffer, 0,67 mol/l, pH 7 (ml)	—	—	—	—	0,10	0,10	0,10	0,10
Borsaures Eluat (ml)	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Standard (a) (ml)	—	—	0,01	0,01	—	—	0,01	0,01
Ameisensäure 2,00 mol/l (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	—	—	—	—
Kupferacetat 1 mmol/l (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
K ₃ [Fe (CN) ₆] 7,59 mmol/l (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Einwirkzeit (min)	3	3	3	3	3	3	3	3
Natriumhydroxid 10 mol/l (ml)	—	0,10	—	—	—	0,10	—	—
Reduktionsreagenz	0,20	—	0,20	0,20	0,20	—	0,20	0,20
Einwirkzeit (min)	3	10	3	3	3	10	3	3
Essigsäure 10 mol/l (ml)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Reduktionsreagenz (ml)	—	0,10	—	—	—	0,10	—	—
Volumen (ml)	1,30	1,30	1,31	1,31	1,30	1,30	1,31	1,31

Die Lösungen werden in der Reihenfolge von oben nach unten zusammengegeben.

a) Standard enthält 5,46 µmol/l (1 mg/l) Adrenalin (für SA₃ und SA₇) bzw. 5,91 µmol/l (1 mg/l) Noradrenalin (für SN₃ und SN₇)

S₃ = Probe (Sample) pH 2,85
 FB₃ = Leerwert (faded blank) pH 2,85
 SA₃ = Innerer (added) Standard Adrenalin pH 2,85
 SN₃ = Innerer (added) Standard Noradrenalin pH 2,85

Wellenlänge
 (Anregung/
 Emission)
 415/490 nm

S₇ = Probe (Sample) pH 7
 FB₇ = Leerwert (faded blank) pH 7
 SA₇ = Innerer (added) Standard Adrenalin pH 7
 SN₇ = Innerer (added) Standard Noradrenalin pH 7

Wellenlänge
 (Anregung/
 Emission)
 390/470 nm

A_S = pmol Adrenalin pro Probe (Sample)

N_S = pmol Noradrenalin pro Probe (Sample)

A₃ = Nettofluoreszenz von 55 pmol (10 ng) „added“ Standard Adrenalin pH 2,85 = SA₃ - S₃

A₇ = Nettofluoreszenz von 55 pmol (10 ng) „added“ Standard Adrenalin pH 7 = SA₇ - S₇

N₇ = Nettofluoreszenz von 59 pmol (10 ng) „added“ Standard Noradrenalin pH 7 = SN₇ - S₇

$$A_S = \frac{54,6 \cdot (S_3 - FB_3)}{A_3}$$

$$N_S = \frac{59,1 \cdot (S_7 - FB_7) - A_S \cdot A_7}{N_7}$$

Stabilität

Der gleichzeitige Gebrauch von Kupferionen und Boratpuffer führte zu einer sehr guten Stabilität von Noradrenalin und einer guten Stabilität von Adrenalin (Abb. 1). Der Abfall der Fluoreszenz von Adrenalin war nach 60 min 10%, nach 120 min 16% und nach 180 min 22%. Wurde Noradrenalin bei pH 7 ohne Cu⁺⁺ oxidiert, war ein „fading“ nachweisbar, ähnlich wie bei Adrenalin. Keine Veränderung der Fluoreszenz konnte bei Noradrenalin und den „faded blanks“ von beiden Katecholaminen nachgewiesen werden.

Einfluß des pH-Wertes

Es wurde der Einfluß des pH (Boratpuffer 0,67 mol/l) während der Oxidation auf die Bildung der Fluorophore geprüft. Während Adrenalin bei pH 3 schon eine volle Fluoreszenzintensität entwickelte, war Noradrenalin noch nicht oxidiert. Noradrenalin hatte ein Fluoreszenzmaximum bei pH 5. Zwischen pH 6 und pH 10 waren nur geringe Unterschiede zwischen beiden Aminen zu beobachten. Wurde Adrenalin bei einer Wellenlänge von 390/470 nm (Anregung/Emission) abgelesen, so

wurden noch etwa 2/3 der Fluoreszenzausbeute gefunden.

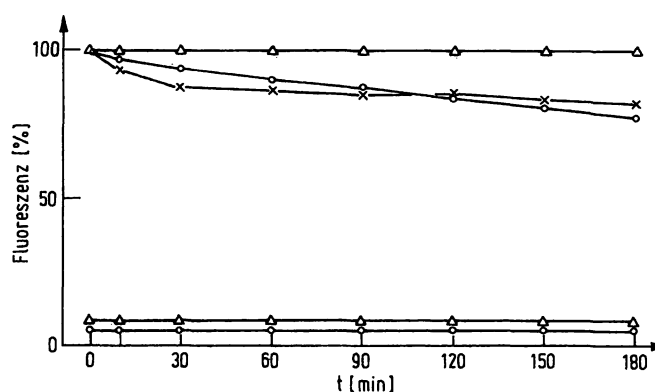


Abb. 1. Stabilität der Fluoreszenzprodukte. 55 pmol Adrenalin bzw. 59 pmol Noradrenalin wurden pro Ansatz in Boratpuffer 0,67 mol/l beigegeben. Adrenalin (○) Adrenalin-Leerwert (△) wurden bei pH 2,85 oxidiert, und Noradrenalin-Leerwert (□) wurden bei pH 7 oxidiert. Noradrenalin ohne Cu⁺⁺ (×), Oxidation bei pH 7. Fluoreszenz wurde sofort nach der Essigsäurezugabe gemessen und auf 100% gesetzt.

Stabilität der Katecholamine im Boratpuffer

Es wurden Standards von 5,46 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin bzw. 5,91 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin in Boratpuffer 0,67 mol/l und Acetatpuffer 0,67 mol/l, pH 3, 6, 7, 8 und 9 hergestellt (Tab. 2). Daraufhin wurden Proben von jedem Standard entnommen und die Fluoreszenz gemessen.

Tab. 2. Stabilität von Adrenalin und Noradrenalin

Boratpuffer 0,67 mol/l, Acetatpuffer 0,67 mol/l. Konzentrationen von Adrenalin 5,46 $\mu\text{mol/l}$ bzw. Noradrenalin 5,91 $\mu\text{mol/l}$ entsprechen 100%. Wiederfindung nach Lagerung von 7 Tagen bei Raumtemperatur (25 °C).

	Boratpuffer		Acetatpuffer	
	Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin
pH 3	100%	100%	74%	69%
pH 6	92%	92%	14%	48%
pH 7	88%	85%	0%	14%
pH 8	88%	81%	0%	0%
pH 9	75%	70%	0%	0%

Die Standards blieben 7 Tage bei Raumtemperatur von 25 °C stehen. Die nun durchgeführte Kontrollbestimmung eines jeden Standards ergab eindeutige Unterschiede zwischen Boratpuffer und Acetatpuffer. Boratpuffer schützt vor oxidativem Abbau. Der Verlust der Katecholamine war außerdem abhängig vom pH-Wert und am geringsten im sauren Bereich.

In Boratpuffer ist der Katecholaminverlust auch im alkalischen Bereich gering, in Acetatpuffer jedoch vollständig.

In Urineluaten (pH 7) ist der Abfall des Adrenalinanteils rascher als in Boratpuffer, er variiert jedoch von Eluat zu Eluat. Es ist deshalb empfehlenswert, die Bestimmung sofort vorzunehmen oder die Eluate kühl zu lagern, um die Verluste gering zu halten.

Der Einfluß von Kupferionen und finaler Ansäuerung

ist in Tabelle 3 zu sehen. Der Effekt von Kupferionen ist besonders deutlich beim Adrenalin. Kupfer ist hier unbedingt erforderlich, gleich, ob die Oxidation bei pH 2,85 oder pH 7 durchgeführt wird. Die Steigerung der Fluoreszenz ist bis zum 25-fachen des Ausgangswertes (A7: Adrenalin pH 7). Die finale Ansäuerung führt zu einer nochmaligen Steigerung der Fluoreszenz (2-fach bei A7, 3-fach bei A3).

Noradrenalin zeigt, bei pH 7 oxidiert, auch ohne Kupfer mit Ansäuern eine hohe Fluoreszenz. Mit Kupfer ist hier ebenfalls eine deutliche Steigerung (etwa 1,7-fach) der Fluoreszenz zu zeigen. Bis zu einer Konzentration von 1 mmol/l Kupferacetat, 50 μl je Probe, war eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nachweisbar.

Tab. 3. Einfluß von Kupferionen und finaler Ansäuerung auf die Fluoreszenzausbeute in Fluoreszenzeinheiten

Jede Probe enthielt 55 pmol Adrenalin oder 59 pmol Noradrenalin in Boratpuffer 0,67 mol/l.

A₃: Adrenalin oxidiert bei pH 2,85

A₇: Adrenalin oxidiert bei pH 7

N₇: Noradrenalin oxidiert bei pH 7

Prozedur	Fluoreszenzausbeute		
	A 3	A 7	N 7
ohne Cu ⁺⁺	5	3	23
ohne Ansäuerung			
ohne Cu ⁺⁺	13	10	98
mit Ansäuerung			
mit Cu ⁺⁺	59	77	92
ohne Ansäuerung			
mit Cu ⁺⁺	180	165	178
mit Ansäuerung			

Höhere Konzentrationen führten zu höheren Leerwerten, und ein flockiges Präzipitat fiel aus.

Der pH-Wert nach Ansäuern liegt zwischen 4,5 und 4,8. Wurde statt einer Essigsäure 10 mol/l eine Essigsäure 5 mol/l verwandt, liegt der pH-Wert bei 5,0. Dabei kam es zu keiner meßbaren Veränderung der Fluoreszenz, jedoch war die Stabilität der Fluoreszenzprodukte geringer. Deshalb wurde eine Essigsäure 10 mol/l bevorzugt.

Kaliumhexacyanoferrat[III] und Leerwert

Die verwendete Konzentration von Ferricyanid ergab optimale Resultate. Reduzierung der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Konzentration maximal um den Faktor 50 führte zu einer geringen Steigerung der Fluoreszenz von Noradrenalin bei einem geringen Rückgang der Leerwerte. Adrenalin, bei pH 2,85 oxidiert, zeigte einen deutlichen Rückgang der Fluoreszenz.

Oxidationszeit und Temperatureinflüsse

Es wurden die Fluoreszenzausbeuten bei Oxidationszeiten von 1, 3 und 5 min über einen Bereich von pH 2–10 geprüft. Eine Verminderung der Fluoreszenz wurde nur für Adrenalin bei pH 3 und 1 min Oxidationszeit festgestellt, so daß 3 min Oxidationszeit als ausreichend angesehen wurden. Wurde die Oxidation im Eisbad durchgeführt, war die Bildung von Adrenolutin bei pH 3 stark herabgesetzt. Eine Verlängerung der Oxidationszeit auf 5 min brachte auch hier keine besseren Ergebnisse. Die Oxidation sollte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Wurden die Proben nach Beendigung der Prozedur kühl gehalten, so erhöhte sich die Fluoreszenz erheblich.

Reduktionsgemisch

Das Reduktionsgemisch enthält Mercaptoäthanol, Natronlauge und Natriumsulfit (s. methodischer Teil).

Im vorliegenden Mischungsverhältnis waren optimale Fluoreszenzen zu erhalten, wenn Boratpuffer verwendet wurde. Bei Acetatpuffer gleicher Molarität war die Fluoreszenzausbeute etwa 1/3 geringer, höhere Natriumhydroxidkonzentration konnte hier die Fluoreszenzausbeute gering verbessern. Mercaptoäthanol in einer Konzentration von 0,709 mol/l ergab ein günstiges Verhältnis zwischen Fluoreszenz- und Leerwert. Diese relativ hohe Konzentration von Mercaptoäthanol sichert die lange Haltbarkeit des fertigen Reduktionsgemisches. Höhere Konzentrationen ergaben hohe Leerwerte. Die Gegenwart von Sulfid war für eine hohe Fluoreszenzausbeute unabdingbar.

Andere Elutionsmedien

Um den Einfluß des Elutionsmediums auf die Fluoreszenzausbeute zu prüfen, wurde neben borsauem Leereluat essigsäures Leereluat erstellt und dann Adrenalin bzw. Noradrenalin zugegeben. Bei einem „Leereluat“ wurde die Säulenprozedur ohne Harn durchgeführt. Wie aus Tabelle 4 zu sehen ist, ist die Fluoreszenzausbeute bei borsauem Eluat besonders günstig, gleich, ob der Ionenaustauscher der Fertigsäulen oder Amberlite CG 50 verwendet wurden. Bei essigsäurem Eluat erweist sich die niedrigere Molarität als günstiger.

Tab. 4. Fluoreszenzausbeute in Leereluaten

Jeder Probe wurden 55 pmol (10 ng) Adrenalin bzw. 59 pmol (10 ng) Noradrenalin zugesetzt. Der Oxidations-pH wurde elektrometrisch eingestellt. Die Fluoreszenzausbeute von Noradrenalin im borsauem Eluat der Fertigsäulen wurden auf 100 gesetzt.

Säule		pH	Fluoreszenz
Fertigsäule eluiert mit Borsäure 0,67 mol/l	Adrenalin	3	86
	Noradrenalin	7	100
Amberlite C G 50 eluiert mit Borsäure 0,67 mol/l	Adrenalin	3	83
	Noradrenalin	7	100
Amberlite C G 50 eluiert mit Essigsäure 1 mol/l	Adrenalin	3	38
	Noradrenalin	6	61
Aluminiumoxid eluiert mit Essigsäure 0,2 mol/l	Adrenalin	3	53
	Noradrenalin	6	76

Fluoreszenzausbeute im Vergleich zu anderen Trihydroxyindolmethoden

Zum Vergleich wurden eine alkalische Trihydroxyindolmethode (2), die auch vom Hersteller der Fertigsäulen empfohlen wird, eine reacidifizierende Thiol-Trihydroxyindolmethode (7) und die vorliegende Methode herangezogen. Es wurden zu jeder Methode die entsprechenden Leereluat erstellt und jeder Probenansatz mit 55 pmol Adrenalin oder 59 pmol Noradrenalin angereicht. Dieses Vorgehen erschien notwendig, da in reinen Lösungen entschieden höhere Fluoreszenzausbeuten gemessen werden. Außerdem wurden Reagenz-

leerwerte, nicht oxidierte Leerwerte (Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat[III] nach Reduktionsreagenz und „faded blanks“ erstellt. Unter diesen Bedingungen waren alle drei Leerwerte für jede Methode gleich, aber auch die Unterschiede zwischen den Methoden waren gering, wenn die Messung unverzüglich vorgenommen wurde. Bei den Angaben in Tabelle 5 erfolgte die Nulleinstellung des Fluorometers mit einem Reagenz-leerwert, die Leerwerte zeigten keine spezifische Fluoreszenz.

Die reacidifizierende Trihydroxyindolmethode (Tab. 5, Methode 2) erbringt gegenüber der alkalischen Trihydroxyindolmethode (Tab. 5, Methode 1) nur für Adrenalin eine Steigerung der Fluoreszenzausbeute. Die hier beschriebene Methode (Tab. 5, Methode 3) weist eine Verbesserung der Fluoreszenzausbeute auf etwa das 3-fache im Vergleich zu der alkalischen Trihydroxyindolmethode (Tab. 5, Methode 1) auf. Allgemein läßt sich sagen, daß die Fluoreszenzausbeuten in Eluaten geringer sind als in reinen Puffern und in Boratpuffer höhere Fluoreszenzausbeuten gefunden werden als in Acetat- oder Phosphatpuffer.

α -Methylnoradrenalin und α -Methyldopa

Da unter Therapie mit α -Methyldopa Harnkatecholaminuntersuchungen mit den üblichen alkalischen Trihydroxyindolmethoden wegen falsch-hoher Werte für die Phäochromocytomausschlußdiagnostik nicht

Tab. 5. Fluoreszenzausbeute verschiedener Trihydroxyindol-Methoden in arbiträren Fluoreszenzeinheiten

Jeder Probe wurden 55 pmol (10 ng) Adrenalin bzw. 59 pmol (10 ng) Noradrenalin zugegeben (n je 6). Die Methoden 1 und 3 wurden mit borsauem Leereluat der Fertigsäulen durchgeführt, Methode 2 mit Leereluat nach (16). Probenansatz zu den Methoden:

- 1) 0,8 ml borsäures Eluat, 0,2 ml Phosphatpuffer 0,5 mol/l pH 6,5, 0,05 ml 0,16 mmol/l Zinksulfat, 0,05 ml 7,59 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat (III), nach 3 min 0,2 ml NaOH (5 mol/l)–113,4 mmol/l Ascorbinsäure (9 : 1, V/V). Gesamtvolumen 1,3 ml. Wellenlänge: Adrenalin 405/520 nm, Noradrenalin 405/495 nm.
- 2) 0,8 ml essigsäures Eluat 1 mol/l, pH 2,85 für Adrenalin, pH 5,8 für Noradrenalin, 0,05 ml Kupferacetat 0,01 mol/l bei Adrenalin, 0,05 ml deionisiertes Wasser bei Noradrenalin, 0,05 ml 7,59 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat (III) nach 5 min 0,2 ml Natronlauge 10 mol/l–0,14 mol/l Mercaptoäthanol in 1,59 mol/l Natriumsulfid (1 : 1, V/V). Nach 4 min 0,2 ml Essigsäure 10 mol/l. Gesamtvolumen 1,3 ml. Präzipitat bei Adrenalin kurz abzentrifugiert. Wellenlänge: Adrenalin 415/500 nm, Noradrenalin 400/485 nm.
- 3) Probenansatz für Methode 3 entspricht den Angaben dieser Arbeit.

Methode	Adrenalin	Noradrenalin
1	40	45
2	52	40
3	127	170

möglich sind, wurde der Einfluß dieses Pharmakons und seiner Metaboliten auf die reacidifizierende Trihydroxyindolmethode geprüft. Es wurde die Katecholaminexkretion bei 13 Patienten bestimmt, die mit 9,5 mmol (2 g) α -Methyldopa täglich behandelt wurden. Wie in Tabelle 6 zu sehen ist, waren die Exkretionswerte für Adrenalin und Noradrenalin bei der reacidifizierenden Trihydroxyindolmethode im unteren Normbereich, bei der alkalischen Trihydroxyindolmethode (6) stark erhöht. Von den geprüften Metaboliten des α -Methyldopa zeigte α -Methylnoradrenalin eine spezifische Fluoreszenz von 6% des Noradrenalins (Tab. 6). Bei der Adrenalinbestimmung (pH 2,85, in Tab. 6 nicht aufgeführt) ergab α -Methylnoradrenalin keine spezifische Fluoreszenz.

Tab. 6. Katecholaminbestimmung im Harn während α -Methyldopa-Therapie (2 g/d)
Die Katecholaminbestimmung erfolgte aus denselben Eluatn (n = 13) mit der hier angegebenen reacidifizierenden Trihydroxyindolmethode und der alkalischen Trihydroxyindolmethode von Häggendal (6).

Methode	Adrenalin nmol/24 h ($\bar{x} \pm s$)	Noradrenalin nmol/24 h ($\bar{x} \pm s$)
Reacidifizierende Trihydroxyindol- methode	27,3 \pm 19,1	98,1 \pm 62,1
Alkalische Trihydroxyindol- methode	1295,7 \pm 354,3	1428,4 \pm 405,4

Um diese Befunde zu spezifizieren, wurde ein Poolurin mit α -Methylnoradrenalin (54,6 μ mol/l, n = 4) angestockt. Während die Adrenalinbestimmung unbeeinflusst war, fand sich eine Vermehrung der Noradrenalinausbeute um 219,3 nmol/l. Das entspricht einer Wiederfindungsrate von nur 60% für α -Methylnoradrenalin.

Bei einer mittleren täglichen α -Methylnoradrenalinexkretion von 147 nmol (18) ist deshalb mit einer falschen Noradrenalin-Mehrbestimmung von 5,9 nmol/Tag zu rechnen.

Spezifität

Um die Spezifität der vorliegenden Methode zu ermitteln, wurden Adrenalin und Noradrenalin, deren Metabolite, chemisch verwandte Phenole und andere biogene Amine in Boratpuffer pH 7 geprüft (Tab. 7). Wenn die Fluoreszenzen von 1 nmol Adrenalin und Noradrenalin auf je 100% gesetzt werden, findet man eine Fluoreszenz von 40% bei Metanephrin und Normetanephrin.

α -Methylnoradrenalin hat noch eine Fluoreszenz von 6%, die übrigen biogenen Amine und Phenole haben keine nennenswerte Fluoreszenz. Die Spezifität und die

Richtigkeit wird durch das Spektrum von Urineluaten und mit Katecholaminen angestockten Urineluaten nachgewiesen (Abb. 2).

Richtigkeit

Vergleichende Untersuchungen von Adrenalin (0,55–1,64 μ mol/l) und Noradrenalin (0,59–1,77 μ mol/l) ohne und mit Ionenaustauschchromatographie ergaben folgende Wiederfindung (%) durch die Säule (Mittelwert \pm Standardabweichung; $\bar{x} \pm s$):

Adrenalin	74,1% \pm 4,3 (n = 12)
Noradrenalin	75,2% \pm 3,6 (n = 12)

Präzision

Zur Untersuchung wurde ein Poolurin (in der Serie) und ein Urin von einem Patienten mit einem Phäochromocytom (von Tag zu Tag) verwendet.

In der Serie ($\bar{x} \pm s$, n = 20):

Adrenalin	33,3 \pm 2,7 nmol/l	VK % = 8,1
Noradrenalin	232,9 \pm 9,5 nmol/l	VK % = 4,1

Von Tag zu Tag ($\bar{x} \pm s$, n = 20):

Adrenalin	681,2 \pm 30,6 nmol/l	VK % = 4,5
Noradrenalin	4933,1 \pm 124,7 nmol/l	VK % = 2,5

Tab. 7. Fluoreszenzentwicklung von Adrenalin und Noradrenalin im Vergleich zu anderen Stoffen

Adrenalin wurde bei der Wellenlänge 415/490 nm (Anregung/Emission) auf 100 gesetzt, Noradrenalin wurde bei 390/470 nm auf 100 gesetzt. Je Probe wurden 1 nmol Reinsubstanz in Boratpuffer 0,67 mol/l, pH 7,0, eingesetzt:

Substanz	Wellenlänge (Anregung/Emission (nm))	
	415/488	388/468
Noradrenalin	61,52	100,00
Adrenalin	100,00	51,60
Normetanephrin	25,05	39,12
Metanephrin	37,70	12,57
α -Methylnoradrenalin	4,69	5,73
3,4-Dihydroxyphenylglycol	0,33	0,14
3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylamin	0,26	0,62
α -Methyl-3,4-dihydroxy-phenylalanin	0,12	0,14
3,4-Dihydroxyphenylalanin	0,07	0,21
Serotonin	0,03	0,04
Tyramin	0,09	0,14
L-Histidin	0,03	0,07
D, L-Tyrosin	0,14	0,20
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	0,08	0,18
3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylenglycol	0,07	0,09
Histamin	0,28	0,27
Vanillinsäure	0,07	0,11
Vanillinmandelsäure	0,32	0,40
Homovanillinsäure	0	0
D, L-Octopamin	0,20	0,35
D, L-3,4-Dihydroxymandelsäure	0,03	0,20
Dopamin	0,25	0,48

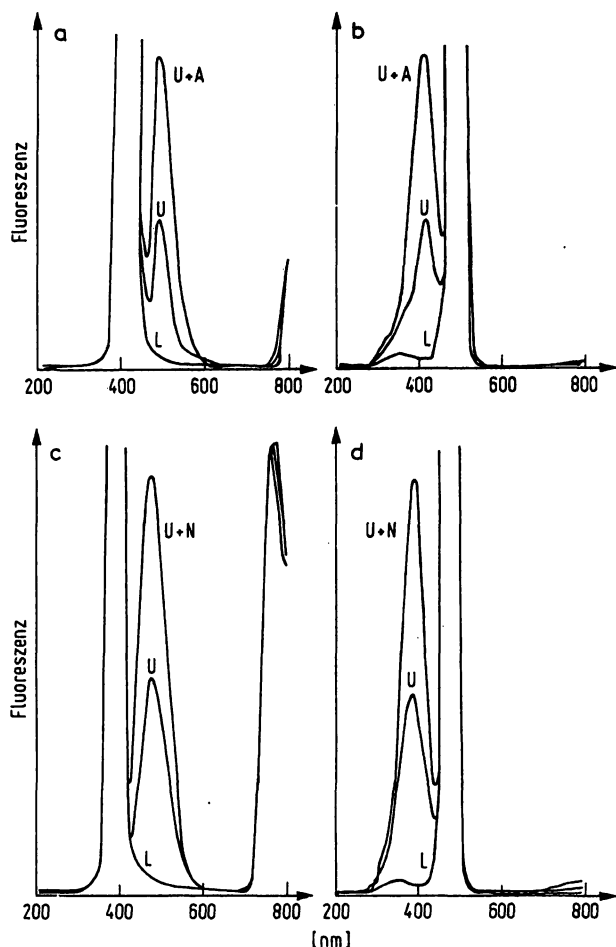


Abb. 2. Fluoreszenzspektrum. Urineluat (U), Leerwert (L), Adrenalin (A), Noradrenalin (N). Die Eluate wurden ohne und mit aufgestocktem Amin (55 pmol Adrenalin oder 59 pmol Noradrenalin) bestimmt. Wellenlängenangabe unkorrigiert.
 a. Emissionsspektrum bei pH 2,85 und einer Anregung von 415 nm.
 b. Anregungsspektrum bei pH 2,85 und einer Emission von 490 nm.
 c. Emissionsspektrum bei pH 7 und einer Anregung von 390 nm.
 d. Anregungsspektrum bei pH 7 und einer Emission von 470 nm.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde gemäß *Kaiser* (10) aus dem Mittelwert des Leerwertes und der Standardabweichung errechnet ($\bar{x} + 3s$).

Adrenalin 3,4 nmol/l
 Noradrenalin 16,3 nmol/l

Normalwerte

Die Untersuchung umfaßt Harne von 17 normotonen, gesunden, im Arbeitsprozeß stehenden Probanden beiderlei Geschlechts.

Adrenalin ($\bar{x} \pm s$) = $44,8 \pm 16,9$ nmol/24 h
 Noradrenalin ($\bar{x} \pm s$) = $224,0 \pm 68,0$ nmol/24 h

Eine Normalverteilung ist bei Normotonikern zwar anzunehmen, konnte aber aufgrund der kleinen Probandenzahl nicht bewiesen werden.

Diskussion

Die chromatographische Trennung erfährt eine wesentliche Erleichterung durch den Gebrauch von Fertigsäulen, auch gegenüber der Batch-Technik mit Aluminiumoxid. Bei den von uns bevorzugten Säulen wird Borsäure als Elutionsmittel gebraucht. Borsäures Eluat war die Voraussetzung für die hier beschriebene Trihydroxyindol-Bestimmungsmethode, bei der die Kombination von Borsäure, Kupferionen, Thiol und finaler Ansäuerung zu einer optimalen Fluoreszenzausbeute führt.

Zuerst berichteten *Trautner & Messer* (11) über eine Schutzwirkung vor oxidativem Abbau der Katecholamine durch Borat. *Gerst* et al. (12) verwendeten Natriumborhydrid und erreichten damit eine Stabilisierung der Fluoreszenz in Probe und Leerwert. *Mattock & Wilson* (13) und *Valori et al.* (14) berichten, daß Borsäure ein gutes Elutionsmittel für Katecholamine ist, wenn das schwache Kationenaustauschharz Amberlite CG 50 verwandt wird. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Sandhu & Freed* (15) beim Gebrauch von Bio-Rex 70.

Wenn Borsäure 0,67 mol/l die Fertigsäulen passiert, verändert sich der pH von 3,8 auf 7,0. Noradrenalin hat jedoch ein Fluoreszenzmaximum, wenn es bei pH 5 oxidiert wird (Abb. 3). Da die Gefahren der Verschleppung, Verunreinigung, Verdünnung und der Zeitaufwand höher einzuschätzen sind als der Gewinn an Fluoreszenzausbeute von etwa 15%, wurde bei den kleinen Volumina bewußt darauf verzichtet, den pH von 7,0 auf 5,0 zu bringen. Außerdem ist Boratpuffer bei pH 5 sehr labil und schwierig einzustellen. Obwohl die Eluate in der Regel sofort bestimmt wurden, können diese auch aufbewahrt werden. Werden die Eluate eingefroren, muß darauf geachtet werden, daß sie bis zur Bestimmung wieder Raumtemperatur angenommen haben, da sonst die Reaktion, besonders bei pH 2,85, nur unvollständig abläuft und Fehlbestimmungen die Folge sind. Auch sollte die fluorimetrische Bestimmung immer bei gleicher Temperatur erfolgen. *Gerst* et al. (12) haben nachweisen können, daß in Kälte die Fluoreszenz der Lutine zunimmt und in Wärme abnimmt. Dieser reversible Prozeß gilt auch für die vorliegende Methode und kann entsprechend verwertet werden. Allerdings beschlagen die kalten Küvetten häufig.

Weil-Malherbe & Bigelow (7) steigerten die Fluoreszenzausbeute der Trihydroxyindolmethode, indem sie Kupferionen als Katalysator einsetzten. Ein vom Kupfer herührendes Präzipitat, das nach der Zugabe von Essigsäure ausfällt, muß bei dieser Methode abzentrifugiert werden. *Wisser* (8) gab eine automatisierte Methode mit einem Auto-Analyzer an, die auf den Angaben von *Weil-Malherbe & Bigelow* (7) beruhte. Er ließ die Zugabe von Essigsäure weg, um das Präzipitat nicht durch einen Dialyseschritt entfernen zu müssen. Allerdings ist

die Fluoreszenzausbeute auch dementsprechend geringer (vgl. Tab. 3). Bei der vorliegenden Methode ist eine geringere Kupferkonzentration erforderlich und ein Präzipitat fällt nicht aus. Deshalb ist es möglich, diese Methode ohne Einbußen zu automatisieren (in Vorbereitung).

Wird Noradrenalin bei pH 7 oxidiert, führt der Zusatz von Kupferionen zu einer Steigerung der Fluoreszenzausbeute um 90% (Tab. 3). Diese Steigerung war in Acetatpuffer nicht möglich. Kupferionen haben zwei mögliche Funktionen: Erstens eine katalytische Funktion während der Oxidation besonders für Adrenalin bei pH 2,85 und zweitens eine die Fluorophore stabilisierende Funktion (Abb. 1) (6). Die zweite Funktion weist auf eine mögliche Reaktion mit den Lutinen hin. Diese Reaktionen werden weiter kompliziert, da Borsäure die Fähigkeit zur Komplexbildung mit Katecholaminen hat (11).

So wie der Katecholamin-Borat-Komplex vor Luftsauerstoff geschützt ist, könnte auch ein Trihydroxyindol-Borat-Komplex vor oxidativem Zerfall geschützt sein.

Die Differenzierung ist sicher optimal, wenn bei pH 2,85 in Gegenwart von Kupferionen ausschließlich Adrenalin, bei pH 7 ohne Kupfer fast ausschließlich Noradrenalin fluoreszierende Lutine bildet (Tab. 3). Diese Art der Differenzierung ist bei der vorliegenden Bestimmungsmethode möglich. Dennoch haben wie es in unserem Labor vorgezogen, auch bei pH 7 in Gegenwart von Kupferionen zu oxidieren. Die spezifische Fluoreszenz erhebt sich hierbei klar über die unspezifischen Begleitprodukte, die Fluoreszenzausbeute ist größer, die Fluoreszenzprodukte sind extrem stabil und eine genaue Bestimmung des kleinen Anteils, nämlich des Adrenalins, bleibt unberührt erhalten.

Noradrenalin wird bei pH 2,85 in der Regel nicht oxidiert. *Weil-Malherbe* (16) fand eine Oxidation von 0–3%. Um gelegentlich bei der Adrenalinbestimmung aufgetretene Fehler zu eliminieren, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Erstens sollte die Molarität der Ameisensäure und der Oxidations-pH kontrolliert und die Bestimmung wiederholt werden. Dabei konnten in unserem Labor bei 5000 Untersuchungen alle Adrenalinbestimmungen exakt durchgeführt werden. Zweitens kann die Oxidation bei pH 2,80 durchgeführt werden, indem eine konzentriertere Ameisensäure (2,1–2,4 mol/l) eingesetzt wird. Eine regelmäßige Kontrolle des Oxidations-pH ist ohnehin empfehlenswert, da bei den verschiedenen Chargen der Fertigsäulen geringe Verschiebungen des Eluat-pH vorkommen können. Drittens besteht die Möglichkeit, die Differenzierung der Amine nach einem der optischen Verfahren vorzunehmen. Die Trennungsgenauigkeit ist dann herabgesetzt. Die Differenzierungsgrenze eines Katecholamingemisches liegt etwa bei einem Verhältnis der Anteile Adrenalin zu Noradrenalin von 1 : 5 für das optische Verfahren und

bei 1 : 20 für das 2-pH-Verfahren (9), wenn Kaliumhexacyanoferrat[III] als Oxidans verwendet wird. Die finale Reacidifizierung auf pH 4,5 verbessert die Fluoreszenzausbeute, stabilisiert Haupt- und Leerwert und vermindert unspezifische Störeinflüsse z. B. durch Serotonin und Histamin (17).

In unserem Labor ist es schon mehrfach vorgekommen, daß im Urin von Patienten mit einer Hepatopathie die Noradrenalinbestimmung mit einer alkalischen Thiol-Methode (6) Werte um 800–1200 nmol/24 h ergab. Die simultan aus demselben Eluat durchgeführte Katecholaminbestimmung mit der vorliegenden Thiol-Methode ergab Normwerte. Wir führen diese gelegentlich auftretende Diskrepanz auf die Elimination unspezifischer Störeinflüsse zurück. Hier kamen diese möglicherweise aus dem Aminosäuremetabolismus. Eine andere Störung der Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung tritt bei den gebräuchlichen Trihydroxyindolmethoden während der Behandlung mit α -Methyldopa auf. Es kommt zur Exkretion beträchtlicher Mengen von α -Methyldopa, α -Methyldopamin und α -Methylnoradrenalin (18) und es werden fälschlich hohe Katecholaminexkretionswerte gefunden, die an ein Phäochromocytom denken lassen.

Die vorliegende Methode wird durch α -Methyldopa-Therapie praktisch nicht gestört, die Exkretionswerte für Adrenalin und Noradrenalin sind erwartungsgemäß herabgesetzt (18).

Eine weitere Verfälschung des Bestimmungsergebnisses scheint durch Metanephrin und Normetanephrin möglich (Tab. 6). Von der Säule werden nur die freien O-methylierten Katecholamine zurückgehalten. Mit der Borsäure werden bei einem Elutionsvolumen bis 7,5 ml keine, bis 10 ml ca. 2% der freien Metanephrene eluiert. Da die täglichen Exkretionswerte nach *Taniguchi et al.* (19) für freies Metanephrin 147 nmol und für freies Normetanephrin 114 nmol betragen, ist mit einer Verfälschung des Adrenalin- und Noradrenalinwertes um etwa 1,7 nmol zu rechnen. Normetanephrin bildet bei pH 2,85 kein Fluoreszenzprodukt. Die durch die freien Metanephrene bedingte Abweichung fällt somit noch in den Bereich der methodischen Streuung, wenn mit 10 ml Borsäure eluiert wird. Die relativ komplizierte Katecholaminbestimmungsmethode wurde einer statistischen Qualitätskontrolle unterzogen. Die Ausbeute von 75% ist befriedigend. Die Präzision in der Serie, ausgedrückt als Variationskoeffizient (V %), kann bei einer Hormonbestimmungsmethode mit chromatographischer Trennung als gut angesehen werden, wenn sie unter 10 % liegt.

Der schwache Punkt einer Harnkatecholaminbestimmung ist die Adrenalinbestimmung. Hier war der Variationskoeffizient 8,1% bei der Bestimmung in der Serie. Der Adrenalinegehalt je Probenansatz betrug dabei nur 4,2 pmol. Würde statt 5 ml Urin ein größeres

Ausgangsvolumen gewählt, wäre der Variationskoeffizient noch zu verbessern. Ein solches Vorgehen ist wegen der begrenzten Bindungsfähigkeit des Harzes einerseits und dem hohen Salzgehalt des Urins andererseits nur bei Säulen mit einer größeren Harzeinwaage zu rechtfertigen. Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

hatte einen niedrigen Variationskoeffizienten, da der Urin des Phäochromocytompatienten einen hohen Katecholamingehalt hatte. Voraussetzung für die insgesamt günstigen Präzisionsangaben war die hohe Fluoreszenzausbeute der angewandten Methode.

Literatur

1. Udenfriend, S. (1964), *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York.
2. Lund, A. (1949), *Acta Pharmacol. Toxicol.* 5, 75–94.
3. von Euler, U. S. & Floding, I. (1955), *Acta Physiol. Scand.* 118, 45–56.
4. von Euler, U. S. & Lishajko, F. (1961), *Acta Physiol. Scand.* 51, 348–356.
5. Palmer, J. F. (1964), *West Indian Med. J.* 13, 38–53.
6. Häggendal, J. (1963), *Acta Physiol. Scand.* 59, 242–254.
7. Weil-Malherbe, H. & Bigelow, L. B. (1968), *Anal. Biochem.* 22, 321–334.
8. Wissner, H. (1970), *Diese Z.* 8, 637–648.
9. Crout, J. R. (1961), *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Vol. 3, pp. 62–80. D. Seligson, Ed., Academic Press, New York.
10. Kaiser, H. (1965), *Z. Anal. Chem.* 209, 1–18.
11. Trautner, E. M. & Messer, M. (1952), *Nature (London)* 169, 31–32.
12. Gerst, E. C., Steinsland, O. S. & Walscott, W. W. (1966), *Clin. Chem.* 12, 659–669.
13. Mattok, G. L. & Wilson, D. L. (1965), *Anal. Biochem.* 11, 575–579.
14. Valori, C., Brunori, C. A., Renczini, V. & Corea, L. (1970), *Anal. Biochem.* 33, 158–167.
15. Sandhu, R. S. & Freed, R. M. (1968), *Clin. Chem.* 14, 824–825.
16. Weil-Malherbe, H. (1968), *Methods Biochem. Anal.* 16, 302–315.
17. Price, H. L. & Price, M. L. (1957), *J. Lab. Clin. Med.* 50, 769.
18. Muscholl, E. & Rahn, K. H. (1968), *Pharmacol. Clin.* 1, 19–29.
19. Taniguchi, K., Kakimoto, Y. & Armstrong, M. D. (1964), *J. Lab. Clin. Med.* 64, 469–484.

Dr. Udo Werner
Medizinische Klinik und Poliklinik
der Universität Essen (GHS)
43 Essen 1
Hufelandstraße 55

